



УДК [577.152.232\*2 + 577.152.341\*1].04

© 1991 г.

*С. Н. Наметкин, А. В. Кабанов, Г. Н. Евтушенко\*,  
Н. Л. Блячко, Е. Ф. Колсазова\*\*, Т. В. Ротанова\*\*,  
Н. Н. Чернов\*, А. В. Левашов*

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ  
АКТИВНОСТИ РАСТВОРИМЫХ И МЕМБРАННЫХ ФОРМ  
ФЕРМЕНТОВ В СИСТЕМАХ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ.  
γ-ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗА И АМИНОПЕПТИДАЗА**

*Кафедра химической энзимологии Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова;*

*\* Кафедра биохимии Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва;*

*\*\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

Проведено сравнительное изучение регуляции каталитической активности растворимых и мембранных форм ферментов в системах обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях. На примере γ-глутамилтрансферазы (в системе обращенных мицелл АОТ в октане) и аминопептидазы (в системе обращенных мицелл Бридж 96 в циклогексане) показано принципиальное различие в регуляции каталитической активности растворимых и мембранных форм ферментов. Каталитическая активность мембранной формы существенно зависит от концентрации ПАВ при постоянной степени гидратации, тогда как каталитическая активность растворимой формы не изменяется в этих условиях. Зависимость каталитической активности от концентрации ПАВ можно рассматривать в качестве теста на мембранотропность ферментов.

В 1977 г. было открыто явление катализа ферментами в системах обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях [1]. К настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал в этой области (см. обзоры [2—4]), однако его обобщение с единых позиций вызывает затруднения, обусловленные в первую очередь существованием двух принципиально различных типов ферментов — водорастворимых и мембранных [5].

Здесь следует отметить, что наблюдаемые кинетические различия в поведении этих двух групп ферментов заложены, по-видимому, изначально различиями в механизмах образования белоксодержащих мицелл [5]. Дело в том, что водорастворимые ферменты, не взаимодействующие с мицеллярной матрицей, могут быть включены в обращенную мицеллу без существенного изменения ее структуры [6, 7], тогда как мембранные ферменты активно участвуют в процессе мицеллообразования и включение фермента в обращенную мицеллу приводит к ее структурным перестройкам [8, 9].

Различия в регуляции каталитической активности этих двух групп ферментов в системе обращенных мицелл наглядно были продемонстрированы [10] на примере нативного и стеарилированного α-химотрипсина. Нативный фермент в этой паре представляет собой типичный водорастворимый белок, тогда как модифицированный (частично гидрофобизованный) можно рассматривать как модель мембранного фермента.

В настоящей работе представлены результаты изучения закономерностей регуляции активности природных водорастворимых и мембранных

Принятые сокращения: ПАВ — поверхностно-активное вещество; аэрозоль ОТ (АОТ) — натриевая соль ди-2-этилгексилевого эфира сульфоянтарной кислоты; Бридж 96 — олеилполи-(10)-этиленгликоль; Тритон X-100 — октилфенилполи-(9—10)-этиленгликоль; НА — 4-нитроанилин; СНА — 3-карбоксы-4-нитроанилин.

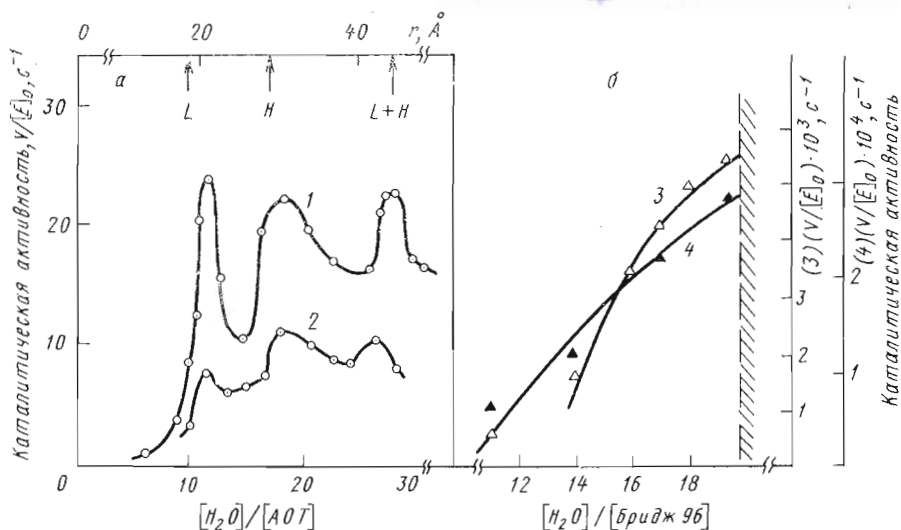


Рис. 1. Зависимости каталитической активности ферментов, солюбилизированных в системах обращенных мицелл, от степени гидратации: а — растворимая (1) и мембранная (2) формы  $\gamma$ -глутамилтрансферазы в системе обращенных мицелл АОТ в октане ( $[AOT] = 0,1$  М) (трансферазная реакция). Для сравнения приведена шкала средних радиусов ( $r$ ) внутренней полости обращенных мицелл. Стрелками отмечены значения радиусов легкой (L) и тяжелой (H) субъединиц, а также их сумма (L + H); б — растворимая (3) и мембранная (4) формы аминопептидазы в системе обращенных мицелл Бридж 96 в циклогексане ( $[Бридж\ 96] = 0,2$  М). Заштрихованная область соответствует фазовому расслоению системы

форм ферментов, а именно  $\gamma$ -глутамилтрансферазы из гепатомы Г-27 [11] и аминопептидазы из мозга быка [12] в системах обращенных мицелл.

**Зависимость каталитической активности ферментов от степени гидратации.** В настоящее время установлено, что каталитическая активность большого числа изученных ферментов в системах обращенных мицелл зависит от степени гидратации ПАВ, причем последняя определяет размер внутренней водной полости мицелл [2—4]. Как правило, такие зависимости имеют колоколообразный вид [2—5]. Максимум каталитической активности обнаруживается при такой степени гидратации, когда радиус внутренней полости мицелл равен радиусу белковой глобулы [3].  $\gamma$ -Глутамилтрансфераза в этом смысле не является исключением, хотя зависимости каталитической активности растворимой и мембранной форм этого фермента в системе обращенных мицелл АОТ в октане имеют вид кривых с тремя оптимумами при  $[H_2O]/[AOT] = 11, 17$  и 26 (рис. 1а), что объясняется обратной диссоциацией фермента на каталитически активные субъединицы [13]. Таким образом, наблюдаемые максимумы соответствуют функционированию легкой ( $M_r$  21 000), тяжелой ( $M_r$  54 000) субъединиц  $\gamma$ -глутамилтрансферазы и их димера ( $M_r$  75 000) [13].

Зависимости каталитической активности двух форм аминопептидазы от степени гидратации в системе обращенных мицелл Бридж 96 в циклогексане имеют вид кривых, которые обрываются из-за расслоения системы (рис. 1б). Вероятно, по этой же причине максимумы на зависимостях не достигаются.

Из рис. 1 можно заключить, что как для  $\gamma$ -глутамилтрансферазы, так и для аминопептидазы нет принципиальных различий между зависимостями, наблюдаемыми для растворимых и мембранных форм ферментов (максимумы на зависимости каталитической активности мембранной формы  $\gamma$ -глутамилтрансферазы менее выражены по сравнению с растворимой формой, однако это отражает скорее количественное, чем качественное различие).

**Зависимость каталитической активности ферментов от концентрации ПАВ.** Варьирование концентрации ПАВ при постоянной степени его



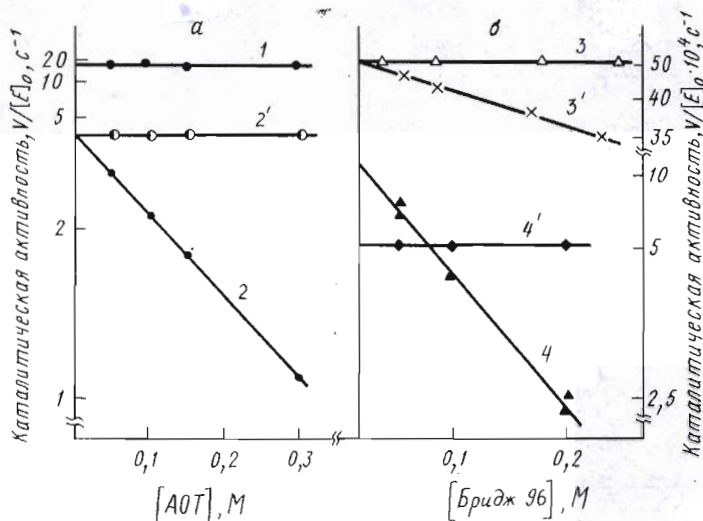


Рис. 2. Зависимости каталитической активности ферментов, солюбилизованных в системах обращенных мицелл от концентрации ПАВ: а — растворимая (1), мембранная (2) и обработанная папаином мембранная (2') формы  $\gamma$ -глутамилтрансферазы в системе обращенных мицелл АОТ в октано ( $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}] = 17,0$ ) (аутокаталитическая реакция); б — растворимая (3), стеарилированная растворимая (3'), мембранная (4) и обработанная папаином мембранная (4') формы аминокептидазы в системе обращенных мицелл Бридж 96 в циклогексане ( $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{Бридж 96}] = 19,5$ )

гидратации сопровождается изменением числа (концентрации) мицелл в системе. При этом в достаточно широком диапазоне концентраций ПАВ основные характеристики мицелл, в частности их размеры, не изменяются [4, 5]. На этом основании можно полагать, что каталитическая активность солюбилизованных ферментов при постоянной степени гидратации не должна зависеть от концентрации ПАВ.

Справедливость этого предположения была подтверждена для водорастворимых ферментов, например  $\alpha$ -химотрипсина [10]. Однако было показано, что зависимость каталитической активности модельного мембранного фермента — стеарилированного  $\alpha$ -химотрипсина — сильно зависит от концентрации ПАВ в системе обращенных мицелл [10].

Аналогичное различие в регуляции каталитической активности растворимых и мембранных форм наблюдается и для  $\gamma$ -глутамилтрансферазы и аминокептидазы (рис. 2). Вид зависимости каталитической активности от концентрации ПАВ для мембранных форм  $\gamma$ -глутамилтрансферазы и аминокептидазы аналогичен наблюдаемой ранее для стеарилированного  $\alpha$ -химотрипсина [10] (эти зависимости линеаризуются в полугиперболических координатах, рис. 2).

Изучаемые в данной работе мембранные формы ферментов содержат гидрофобный пептидный якорь, благодаря которому они связываются с клеточной мембраной [14—17]. Отщепление этого якоря в результате обработки фермента папаином приводит к исчезновению наблюдаемых зависимостей (рис. 2). В то же время аналогичная зависимость появляется после перевода водорастворимой формы аминокептидазы в мембранную путем ее химической модификации гидрофобными якорными группами — остатками стеариновой кислоты (рис. 2б).

Таким образом, полученные данные показывают, что зависимость каталитической активности от концентрации ПАВ может служить простым и информативным тестом на мембранотропность ферментов.

### Экспериментальная часть

**Ферменты.** Растворимую форму  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (КФ 2.3.2.2) выделяли из перевивной низкокодифференцированной гепатомы Г-27 по методике, включающей в себя солюбилизацию фермента папаином [11].

Метод очистки растворимой формы  $\gamma$ -глутамилтрансферазы состоял из следующих стадий: солюбилизации (2 ч, 20° С) ферментов из мембран свежeweделенных 20-дневных гепатом смесью луброла (Sigma, США), и дезоксихолата натрия (Serva, ФРГ), фракционирования раствора  $\gamma$ -глутамилтрансферазы сульфатом аммония, обработки раствора фермента папаином, фракционирования сульфатом аммония и гель-фильтрации на сефадексе G-150 в 10 мМ трис-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 0,1 М NaCl. Чистоту полученного препарата ( $M_r$  75 000) контролировали с помощью электрофореза на полиакриламидных пластинках в присутствии додецилсульфата натрия. Активность выделенного фермента составляла 30 ед./мг (единица соответствует активности, при которой за 1 мин гидролизует 1 мкмоль CluNA при pH 8,5 и 25° С). Мембранную форму  $\gamma$ -глутамилтрансферазы экстрагировали из гомогената гепатомы Г-27 раствором 1% луброла [11] и использовали в кинетических экспериментах без дальнейшей очистки.

*Растворимую форму аминопептидазы* (КФ 3.4.11) выделяли из мозга быка по методике [12]. Методика выделения фермента включала в себя следующие стадии: экстракцию гомогената ткани коры мозга буферным раствором, обработку экстракта стрептомицин-сульфатом, фракционирование сульфатом аммония, хроматографию на DEAE-сефарозе и АН-сефарозе 4В. Активность выделенного фермента составляла 0,1 ед./мг (единица соответствует активности, при которой за 1 мин гидролизует 1 мкмоль LeuNA при pH 7,2 и 37° С).

*Мембранную форму аминопептидазы* выделяли из гомогената ткани коры мозга экстракцией 1% раствором Тритона X-100 (Sigma) по измененной методике [12], которая не включала в себя описанные в работе [12] стадии ионообменной хроматографии.

Концентрации белка в полученных ферментных препаратах определяли по методу Бредфорд [18].

*Обработка ферментов папаином.* К 0,5 мл раствора мембранной формы  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (или аминопептидазы) в 50 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,5) добавляли 20 мкл 6,3 мМ раствора папаина (Sigma). После 1 ч инкубации с папаином при 20° С фермент отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-150.

*Модификация аминопептидазы стеарилохлоридом* [19]. В 7 мл 0,2 М раствора Бридж 96 (Sigma) в циклогексане (Merck, ФРГ) солюбилизировали 70 мкл 330 мкМ раствора аминопептидазы в 0,1 М боратном буфере (pH 9,5). Систему интенсивно встряхивали до достижения оптической прозрачности и затем добавляли 25 мкл 80 мМ раствора стеарилохлорида (Sigma) в циклогексане.

Модифицированный фермент не выделяли из реакционной среды: полученный мицеллярный раствор использовали непосредственно в кинетических экспериментах. Для получения мицеллярной системы заданной степени гидратации и концентрации ПАВ к исходному раствору добавляли раствор Бридж 96 в циклогексане и 50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,5) (в независимом эксперименте было установлено, что присутствие в системе свободной стеариновой кислоты в концентрации до 0,1 мМ не влияет на каталитическую активность аминопептидазы в системе обращенных мицелл).

*Каталитическая активность  $\gamma$ -глутамилтрансферазы в системе обращенных мицелл* [13]. В 2 мл 0,3 М раствора АОТ (Merck) в октане солюбилизировали 20 мкл 1 мкМ  $\gamma$ -глутамилтрансферазы и 30—360 мкл 0,5—50 мМ GluCNA (Sigma) в 25 мМ трис-HCl-буфере (pH 8,8). Для получения мицеллярных систем с различными концентрациями АОТ исходный раствор разбавляли октаном. При измерении скорости трансферазной реакции солюбилизируемые водные растворы содержали 0,1 М GlyGly.

Скорость реакции образования CNA определяли спектрофотометрически при 400 нм и 25° С.

*Каталитическая активность аминопептидазы в системе обращенных мицелл.* В 2 мл 0,2 М раствора Бридж 96 в циклогексане солюбилизировали



ли 20 мкл 6 мкМ раствора аминопептидазы в 50 мМ трис-HCl-буфере (рН 7,5) и 20—240 мкл этого буфера. Для получения мицеллярных систем с различными концентрациями Бридж 96 исходный раствор разбавляли циклогексаном. Реакцию начинали добавлением 10 мкл 40—400 мМ раствора LeuNA (Boehringer, ФРГ) в ацетонитриле (Союзреактив). Скорость реакции образования 4-нитроанилина определяли спектрофотометрически при 400 нм и 25° С.

Использовали спектрофотометр Beckman 25 (США) с термостатируемым кюветным отделением. В независимом эксперименте измеряли молярные коэффициенты поглощения NA (CNA) в системе обращенных мицелл АОТ (Бридж 96) при различных степенях гидратации и концентрациях ПАВ.

Значения  $V/E_0$  определяли по методу Лайнуивера — Берка в условиях насыщения ферментов субстратами: GluCNA и GlyGly (трансферазная реакция), GluCNA (аутотрансферазная реакция) в случае  $\gamma$ -глутамилтрансферазы или LeuNA (аминопептидаза). В работе анализируются рН-независимые кинетические параметры.

В независимом эксперименте было установлено, что Тритон X-100 и дуброл, которые использовались при выделении ферментов, не влияют на активность мембранных форм аминопептидазы и  $\gamma$ -глутамилтрансферазы в системах обращенных мицелл.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 236. № 4. С. 920—923.
2. Luisi P. L., Magid L. J. // Crit. Rev. Biochem. (CRC). 1986. V. 20. P. 409—474.
3. Martinek K., Klyachko N. L., Kabanov A. V., Khmelnskiy Yu. L., Levashov A. V. // Biochim. et biophys. acta. 1989. V. 981. P. 161—172.
4. Structure and Reactivity in Reverse Micelles / Ed. Pileni M. P. Elsevier. Amsterdam; Oxford; New York; Tokyo, 1989.
5. Кабанов А. В., Клячко Н. Л., Пшежецкий А. В., Наметкин С. Н., Мартинек К., Левашов А. В. // Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. № 1. С. 275—286.
6. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Черняк В. Я., Мартинек К. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 1. С. 86—99.
7. Shapiro Yu. E., Budanov N. A., Levashov A. V., Klyachko N. L., Khmelnskiy Yu. L., Martinek K. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1989. V. 54. P. 1126—1134.
8. Montal M. // Reverse Micelles / Eds Luisi P. L., Straub V. E. N. Y.: Plenum Press, 1984. P. 221—229.
9. Wirz J., Rosenbuch J. P. // Reverse Micelles / Eds Luisi P. L., Straub V. E. N. Y.: Plenum Press, 1984. P. 231—238.
10. Кабанов А. В., Левашов А. В., Мартинек К. // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 1986. Т. 27. № 6. С. 591—594.
11. Логинов В. А., Чернов Н. Н., Березов Т. Т. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1980. № 7. С. 58—60.
12. Колесанова Е. Ф., Ротанова Т. В., Америк А. Ю., Гинодман Л. М., Антонов В. К. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 340—356.
13. Наметкин С. Н., Кабанов А. В., Евтушенко Г. Н., Чернов Н. Н., Березов Т. Т., Щеголев А. А., Рыжова В. В., Клячко Н. Л., Мартинек К., Левашов А. В. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 70—77.
14. Tate S. S., Meister A. // Mol. Cell. Biochem. 1981. V. 39. P. 1749—1781.
15. Tsuji A., Matsuda Y., Katunuma N. // J. Biochem. (Tokyo). 1980. V. 87. P. 1567—1571.
16. Hersh L. B., McKelvy J. F. // J. Neurochem. 1981. V. 36. P. 171—178.
17. Maroux S., Louvard D. // Gastroenterol. Clin. Biol. 1977. V. 1. P. 377—388.
18. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248—254.
19. Kabanov A. V., Levashov A. V., Martinek K. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1987. V. 501. P. 63—66.

Поступила в редакцию  
16.VII.1990

S. N. NAMETKIN, A. V. KABANOV, G. N. EVTUSHENKO\*, N. L. KLYACHKO,  
E. F. KOLESANOVA\*\*, T. V. ROTANOVA\*\*, N. N. CHERNOV\*, A. V. LEVASHOV

THE PRINCIPAL DIFFERENCE IN REGULATION OF THE CATALYTIC  
ACTIVITY OF WATER SOLUBLE AND MEMBRANE FORMS OF ENZYMES  
IN REVERSED MICELLES.  $\gamma$ -GLUTAMYLTRANSFERASE  
AND AMINOPEPTIDASE

*Department of Chemical Enzymology, M. V. Lomonosov Moscow State University;*

*\*Chair of Biochemistry, P. Lumumba State University, Moscow;*

*\*\*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

The regulations of functioning of water soluble and membrane forms of enzymes in the systems of reversed micelles of surfactants in organic solvents are compared. By an examples of  $\gamma$ -glutamyltransferase (in AOT reversed micelles in octane) and aminopeptidase (in Brij 96 reversed micelles in cyclohexane) the principal difference in the catalytic activity regulation of water soluble and membrane forms is demonstrated. The catalytic activity of the membrane form depends largely on the surfactant concentration at the constant hydration degree, whereas the activity of the water soluble form is constant under these conditions. The catalytic activity dependence on the surfactant concentration is regarded as a «test for the enzyme's membrane activity».